

# 体外反搏对心肌梗死犬一氧化氮和一氧化氮合酶的影响<sup>①</sup>

钱孝贤<sup>2</sup> 郑振声<sup>1</sup> 吴伟康<sup>1</sup> 陈燕铭<sup>2</sup> 高国全<sup>3</sup> 张书刚<sup>2</sup> 陆 丽<sup>1</sup>

(中山医科大学 1 卫生部辅助循环重点实验室; 广州, 510089 2 第三临床学院心内科 3 生物化学教研室)

**摘要 目的:**探讨体外反搏对心肌梗死犬一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(NOS)的作用。**方法:**15只健康杂种犬随机分为对照组、缺血组和反搏组3组,采用开胸结扎冠状动脉左前降支的方法建立心肌缺血模型,用改良硝酸还原酶法测定心肌缺血前后血清NO含量、以及心肌组织的NO含量和NOS比活性,并用电镜观察犬心肌组织超微结构的损伤程度。**结果:**在冠状动脉结扎前和结扎后60 min,3组犬血清NO含量均无差异( $P > 0.05$ );结扎后120 min和180 min时,反搏组犬血清NO含量明显高于缺血组( $P < 0.05$ )。正常组和反搏组犬心肌组织NO含量和NOS比活性均大于缺血组( $P < 0.05$ )。电镜显示反搏组犬心肌组织的线粒体、肌节和血管内皮细胞损伤较缺血组轻。**结论:**体外反搏对心肌缺血性损伤有保护作用,其中NO和NOS可能起重要作用。

**关键词** 心肌缺血; 一氧化氮; 反搏动术; 狗

**中图分类号** R 542.2

## Effects of External Counterpulsation on the Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthase in Myocardial Infarction Canines

Qian Xiaoxian<sup>2</sup> Zheng Zhensheng<sup>1</sup> Wu Weikang<sup>1</sup> Chen Yanming<sup>2</sup> Gao Guoquan<sup>3</sup> Zhang Shugang<sup>2</sup> Lu Li<sup>1</sup>

(1 The Key Laboratory on Assisted Circulation of Ministry of Health 2 Department of Cardiology of the Third Affiliated Hospital 3 Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

**Abstract Objective:** To investigate the effects of external counterpulsation (ECP) on the nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in myocardial infarction canines. **Methods:** Fifteen health dogs were randomly divided into three groups (ischemia group, ECP group and controls). The myocardial ischemic model was set up by ligating of the left anterior descending artery (LAD). Before and after the ligation of the LAD, the serum NO concentrations and myocardium NO levels and NOS specific activity were determined by modified nitrate reductase method. At the same time the myocardium was taken for electromicroscopy. **Results:** Before and 60 min after the ligation of the LAD, the serum NO levels had no significant difference among this three groups ( $P > 0.05$ ); but 120 and 180 min later, the serum NO concentration in ECP groups were higher than those in ischemic groups ( $P < 0.05$ ). The NO levels and NOS specific activity in myocardium of ischemic dogs were lower than those in controls and ECP group ( $P < 0.05$ ). Electromicroscopically, the injuries of the myocardium including sarcomeres, mitochondria and microvascular endothelial cells were less obvious in ECP group than those in the ischemia group. **Conclusions:** ECP treatment could effectively protect the myocardium against ischemic injury, in which NO and NOS may exert an important role.

**Subject heading** myocardial ischemia; nitric oxide; counterpulsation; dogs

一氧化氮(nitric oxide, NO)是内皮细胞分泌的重要血管活性物质,是在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的催化下, L-精氨酸与分子氧作用而产生的,其广泛参与机体多种生理功能。从动物实

验和临床实验中均发现,NO参与心肌缺血的发病机制,在心肌缺血时由于内皮功能受损,产生NO减少,引起了一系列的病理生理变化<sup>[1]</sup>。增强型体外反搏(enhanced external counterpulsation, EECP)是一种新

型、无创性辅助循环装置,临床证明增强型体外反搏对冠心病具有较好的疗效<sup>[2]</sup>。但是,目前有关体外反搏对心肌缺血时 NO 和 NOS 的影响研究尚不多见。本研究通过动物实验观察体外反搏对急性心肌缺血犬体内 NO 和 NOS 的影响,以探讨体外反搏治疗心肌缺血的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

健康成年杂种犬 15 只,雌雄兼用,(15±3) kg,由中山医科大学动物实验中心提供。将动物随机分为 3 组,即正常对照组(对照组)4 只、心肌缺血组(缺血组)5 组、体外反搏组(反搏组)6 只。

### 1.2 手术方法

实验动物用戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内麻醉,气管插管,连接电动人工呼吸机(SC-2 型,上海仪器设备厂生产)。分离右颈外静脉,插管备取血用。左胸第 IV-V 肋间开胸,暴露心脏,剪开心包并缝制心包吊床,左侧颈总动脉插管至主动脉根部,导管对外接压力换能器(TP-400T,日本光电公司生产),联结多导生理记录仪(RM-6000,日本光电公司生产),以监测动脉压;左心室心尖部直接插管,导管对外接压力换能器,以监测心功能变化。在左冠脉前降支(left anterior descending artery, LAD)第 1-2 分支间分离冠状动脉以备结扎,造成心肌缺血模型。对照组在上述准备的基础上,平衡相关的指标,用假结扎的方法(冠脉分离穿线不结扎);缺血组及反搏组则分离冠脉并结扎。对照组和缺血组动物不处理,反搏组在冠脉结扎后 60 min 进行体外反搏,连续 120 min。选用佛山分析仪器厂双山牌增强型体外反搏装置(EECP-MC2),反搏气囊充气压力为 0.035~0.04 MPa/cm<sup>2</sup>。各组均于结扎前,结扎后 60 min、120 min(反搏组则为反搏后 60 min)、180 min(反搏组则为反搏后 120 min)分别采血检测血清 NO 的含量,然后快速放血处死动物,取缺血区域心肌组织检测 NO 和 NOS 的含量。术中用心外膜心电图监测心肌缺血情况。

### 1.3 标本的处理

采取静脉血,在 30 min 内 4 °C 低温离心分离血清,分装后置-70 °C 冰箱保存,分批检测 NO 含量;取缺血区心肌组织约 100 mg 置预冷生理盐水中清洗,马上放入液氮中,然后转移置-70 °C 冰箱保存,

分批检测 NOS 的活性;另取 0.5 cm×0.5 cm 心肌放入 30 g/L 戊二醛中固定送电镜室进行透射电镜观察。

### 1.4 血清 NO 的测定

采用硝酸还原酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶法<sup>[3]</sup>。体内产生的 NO 氧化生成亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>),一部分亚硝酸盐进一步氧化生成硝酸盐(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>),所以,只测定 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量不能准确反映体内产生的 NO 含量。本实验采用硝酸还原酶将氧化还原生成的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 先还原成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,再同 Griess 试剂反应测定 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量,以此表示 NO 的量。但在此过程中辅酶 NADPH 氧化生成 NADP<sup>+</sup>,NADP<sup>+</sup> 严重干扰 Griess 反应,因此需用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶将 NADP 重新还原为 NADPH。具体步骤如下:

1.4.1 水杨酸沉淀法制备无蛋白滤液 取血清或组织匀浆上清液 200 μL 加入质量分数为 35% 磺基水杨酸 100 μL,在旋涡混匀器上混匀(QL-901 型,江门海门其林医用仪器厂生产),离心 10 000×g 3 min(TGL-1G 型,上海医用分析仪器厂生产),取上清 50 μL 备检测用(即无蛋白质滤液)。

1.4.2 亚硝酸盐标准曲线制备 配制亚硝酸钠系列标准品溶液,其中 A 液(质量分数为 0.1% 的萘乙基二胺盐酸盐溶液)和 B 液(质量分数为 1% 的对氨基苯磺酰胺,体积分数为 5% 磷酸缓冲液)即 Griess 试剂,上述各管混匀置 20 °C,10 min,用分光光度计测定 A<sub>546</sub> 值。以亚硝酸钠浓度为横坐标, A<sub>546</sub> 吸光度为纵坐标,绘制标准曲线(表 1)。

1.4.3 血清 NO 浓度测定 取 50 μL 无蛋白质滤液加 40 μL 酶液(硝酸还原酶 80 U/L,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 160 U/L,葡萄糖-6-磷酸 50 μmol/L,磷酸缓冲液 pH 7.4);再加入 10 μL 还原性辅酶 II(NADPH, 200 mmol/L),混匀;置 20 °C 45 min;然后加入磷酸缓冲液 400 μL、A 液和 B 液各 250 μL,混匀置 20 °C,10 min。测定每个样品的 A<sub>546</sub> 值,再于标准曲线上查得 {c<sub>NO</sub>/(μmol/L)} = 246.37×A<sub>546</sub> - 2.23。

### 1.5 心肌组织 NO 质量摩尔浓度和 NOS 比活性的测定

心肌组织 NO 上清液的制备同 NOS 抽提液的制备,NO 测定方法同前。制备 NOS 抽提液:心肌组织约 100 mg(剪碎)加 2mL 预冷缓冲液(10 mmol/L HEPES, pH 7.4,蔗糖 0.32 mol/L,0.5 mol/L EDTA,1.0 mmol/L DTT,100 mg/L PMSF),在冰浴中匀浆,匀浆液置 4 °C 12 000×g 离心 30 min,上

清液即 NOS 抽提液。取 NOS 抽提液 0.5 mL 用 Lowry 法测定蛋白质质量分数。心肌 NOS 比活性的测定: 通过测定单位时间单位质量蛋白质的组织裂解液催化 L-精氨酸产生的 NO 量来反映组织 NOS 的总活性<sup>[4]</sup>, 取 NOS 抽提液 0.5 mL 加 0.5 mL 基质液(2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、200 CaCl<sub>2</sub>、200 L-Arg、200

NADPH), 摇匀置 37 °C 10 min。取上述反应液(NOS 反应液)500 μL, 制备无蛋白质滤液, 取滤液 50 μL 测定 NO 含量, 方法同前。涉及公式为:

$$\{ \text{心肌 NOS 比活性 } z/m \text{ (NOS)} / (\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) \} = \{ \text{心肌 NOS 反应液 NO 浓度} \} - \{ \text{心肌组织 NO 浓度} \} / \{ \text{蛋白质浓度} \} \times 600.$$

表 1 亚硝酸钠标准曲线制备  
Table 1 Preparation of standards curve of sodium nitrite

	$c^{\ominus}(\text{NaNO}_2, \text{sln}) / (\mu\text{mol/L})$						
	0	5	10	20	40	80	160
$V(1 \text{ mmol/L NaNO}_2) / (\mu\text{L})$	0	5	10	20	40	80	160
$V(\text{H}_2\text{O}) / (\mu\text{L})$	500	495	490	480	460	420	340
$V(\text{Solution A}) / (\mu\text{L})$	250	250	250	250	250	250	250
$V(\text{Solution B}) / (\mu\text{L})$	250	250	250	250	250	250	250
$A_{546} / (1)$	0	0.023	0.048	0.090	0.175	0.345	0.652

### 1.6 统计方法

计量资料用均数±标准差表示( $\bar{x} \pm s$ ), 多组间比较用方差分析, 所有资料均在电脑上用 SPSS 8.0 软件包处理。

## 2 结果

### 2.1 在治疗过程中各组犬血清 NO 浓度的变化

在冠脉结扎前和结扎后 60 min 各组犬血清 NO 浓度均无显著性差异, 但在 120 min 和 180 min 时(反搏 60 min 和 120 min), 反搏组犬血清 NO 浓度明显高于缺血组( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 冠脉结扎前后犬血清 NO 浓度变化

Table 2 Changes of the serum NO concentration in dogs before and after LAD ligation  $c_{\text{NO}} / (\mu\text{mol/L})$

Groups	<i>n</i>	Before ligation	60 min after ligation	120 min after ligation	180 min after ligation
Controls	4	70±15	64±10	68±13	72±16
Ischemia	5	78±11	53±4	54±8	51±12
ECP	6	77±15	54±4	80±20 <sup>1)</sup>	85±16 <sup>1)</sup>

1) Compared with ischemia group;  $P < 0.05$

### 2.2 各组犬心肌 NO 质量摩尔浓度和 NOS 比活性

正常组和反搏组犬心肌 NO 的质量摩尔浓度和 NOS 比活性均高于缺血组( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 各组犬心肌 NO 质量摩尔浓度和 NOS 比活性

Table 3 The NO concentrations and NOS specific activity in the myocardium of dogs

Groups	<i>n</i>	$m_{\text{NO}} / (\mu\text{mol/g})$	$z/m \text{ (NOS)} / (\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$
Controls	4	69±19 <sup>1)</sup>	0.08±0.033 <sup>1)</sup>
Ischemia	5	24±13	0.03±0.016
ECP	6	62±20 <sup>1)</sup>	0.07±0.026 <sup>1)</sup>

1) Compared with ischemia group;  $P < 0.05$

### 2.3 电镜结果

正常犬心肌超微结构显示, 肌小节均匀, 血管内膜完整。缺血组犬心肌的肌小节粗细不均, 心肌纤维因水肿而间隙疏松, 肌膜溶解, 线粒体体积增大, 嵴断裂, 血管内膜肿胀, 管腔狭窄(图 1)。反搏组犬心肌超微结构损伤较轻(图 2)。

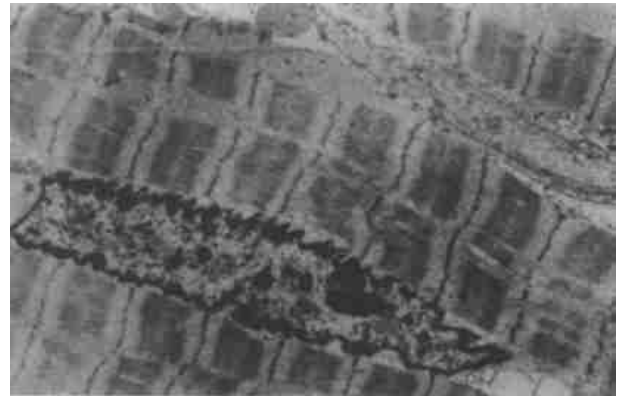


图 1 缺血犬心肌(6 610×)

Fig.1 Ischemia canine myocardium(6 610×)

The width of sarcomers varied and the spaces between myofibrillae enlarged. The volume of mitochondria increased and shaped round. Capillary endothelial cells showed edema, and vessels narrowed

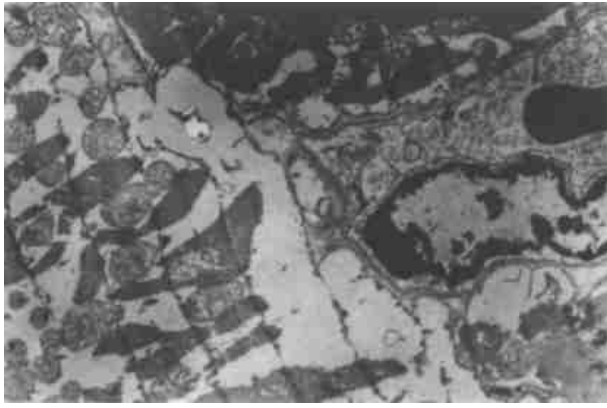


图2 ECP犬心肌(2 950×)

Fig.2 ECP canine myocardium

The injury of the ultrastructure was less obvious

### 3 讨论

NO 主要来源于血管内皮细胞,它是内皮细胞产生的最强的舒血管物质,在NO的前体充分存在的前提下,NO的合成受内皮细胞中NOS的表达和活性的调节。现已证实引起NO释放的刺激形式主要有两种,一种是化学刺激如缓激肽和乙酰胆碱等,另一种是机械刺激,如血管张力、切应力、内皮细胞变形及血液脉冲流动等<sup>[5]</sup>。内皮细胞在体外培养时,切应力可促进内皮细胞NOS的磷酸化和NOS基因表达<sup>[6,7]</sup>。在缺血(缺氧)时,内皮功能受损,产生NO减少,引起一系列的病理生理变化,实验发现内源性NO可保护心肌缺血再灌注时的心肌损伤,而给予NO的抑制剂则可扩大心肌梗死面积<sup>[8]</sup>。

本实验发现,在冠脉结扎前和结扎后60 min 各组犬血清NO含量均无显著性差异,说明各组资料间有可比性。在90 min和180 min时(反搏60 min和120 min),反搏组犬血清NO含量明显高于缺血组( $P < 0.05$ ),这可能是由于体外反搏增加了冠脉的血流灌注,改善了心肌的血液供应,减轻了心肌的缺血状态,因为我们在实验中观察到反搏可提高主动脉根部舒张压,增加心输出量,改善心脏收缩和舒张功能(资料另行发表);同时由于体外反搏可提高切应力,可能刺激血管内皮产生NO增多有关。临床观察也发现体外反搏可增加冠心病患者血清NO水平,本实验结果与此相一致<sup>[9]</sup>。本研究还发现正常组和反搏组犬心肌NO含量高于缺血组( $P < 0.05$ ),而且正常组和反搏组犬心肌NOS活性均高于缺血组。此结果进一步说明体外反搏

可增强NOS的活性,促进NO的产生。心肌超微结构的改变是反映心肌缺血损伤的敏感指标。本实验结果显示,体外反搏可明显减轻心肌缺血时犬心肌超微结构的损伤程度,对缺血心肌有保护作用。综合本实验结果,体外反搏的这种心肌保护作用可能与NO和NOS有关。今后,我们将继续观察体外反搏对心肌NOS的不同亚型的影响,以及对NOS基因的作用,深入研究体外反搏的作用机制,以更好地为临床服务。

(感谢卫生部辅助循环重点实验室方典秋老师、钱月桃老师、梁陆光老师、周少春博士、伍贵富老师和伍富军老师在动物实验中给予的热情帮助,感谢电镜教研室吴义芳老师和吴金浪老师在电镜观察过程中的悉心指导)

### 参 考 文 献

- 1 Ma X, Weyrich A S, Lefer D J, *et al*. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res*, 1993, 72(2): 403
- 2 Lawson W E, Hui J C, Zheng Z S, *et al*. Improved exercise tolerance following enhanced external counterpulsation: cardiac or peripheral effect? *Cardiology*, 1996, 87(4): 271
- 3 Verdon C P, Burton B A, Prior R L. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by  $\text{NADP}^+$  when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem*, 1995, 224(2): 502
- 4 Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, *et al*. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor- $\beta$ . *J Exp Med*, 1993, 178(2): 605
- 5 李中言,赵连友. 一氧化氮与心血管疾病. *中华心血管病杂志*, 1996, 24(1): 73
- 6 Corson M A, James N L, Latta S E, *et al*. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*, 1996, 79(5): 984
- 7 Kuchan M J, Frangos J A. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol*, 1994, 266(3Pt 1): C628
- 8 Williams M W, Taft C S, Ramnauth S, *et al*. Endogenous nitric oxide(NO) protects against ischemia-reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc Res*, 1995, 30(1): 79
- 9 钱孝贤,吴伟康,郑振声,等. 增强型体外反搏对冠心病患者血清一氧化氮和丙二醛的影响. *中国病理生理杂志*, 1999, 15(1): 14

(1998-11-24 收稿 1999-09-20 修回)